

YASMIM MARIA B. —
G. DE CARVALHO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO FORMADOS ENTRE
ACETATO DE HECOGENINA E β -CICLODEXTRINA



Universidade Federal de Sergipe

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
COMPLEXOS DE INCLUSÃO FORMADOS ENTRE
ACETATO DE HECOGENINA E β -CICLODEXTRINA**

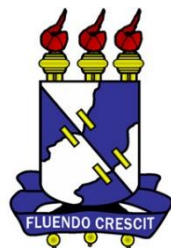
Dissertação de Mestrado apresentada por

YASMIM MARIA BARBOSA GOMES DE CARVALHO



SÃO CRISTÓVÃO-SE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS
DE INCLUSÃO FORMADOS ENTRE ACETATO DE
HECOGENINA E β -CICLODEXTRINA

YASMIM MARIA BARBOSA GOMES DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Núcleo de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

SÃO CRISTÓVÃO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Carvalho, Yasmim Maria Barbosa Gomes de

C331p Preparação e caracterização de complexos de inclusão formados entre acetato de hecogenina e β -ciclodextrina / Yasmim Maria Barbosa Gomes de Carvalho; orientador Adriano Antunes de Souza Araújo. – São Cristóvão, 2016.

35 f.: il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Ciclodextrinas. 2. Complexos de inclusão. 3. Acetato de hecogenina. I. Araújo, Adriano Antunes de Souza, orient. II. Título.

CDU 615.45

Folha de aprovação

YASMIM MARIA BARBOSA GOMES DE CARVALHO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS
DE INCLUSÃO FORMADOS ENTRE ACETATO DE
HECOGENINA E β -CICLODEXTRINA

Dissertação apresentada ao Núcleo de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau
de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 26/02/2016

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

1º Examinador: Prof. Dr^a Larissa Araújo Rolim

2º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

AGRADECIMENTOS

Aqui, agradeço a todos vocês que contribuíram para que mais um ciclo em minha vida fosse concluído com sucesso, sem vocês, com certeza não seria possível.

- A Deus e a minha família, minha base, de onde tudo começou;
- Ao meu esposo, meu amigo e companheiro, por todo incentivo, paciência e amor;
- Aos meus professores do ensino primário, fundamental, médio, da graduação e pós-graduação, vocês foram fundamentais para construção do conhecimento, como já dizia: *“Professores ensinam as lições do ofício, semeiam em nós à vontade de tocar nossa própria música e escolher as notas que nos cabem, com a coragem e a perícia para acreditarmos em nós mesmos”*. (Autor desconhecido);
- Aos meus grandes amigos;
- Ao meu orientador Prof. Adriano Antunes e a família LeFT (Paula Menezes, Mairim, Anny, Bruna, Bruno, Caio, Carla, Dayane, Francielly, Gabriela, Guilherme, Igor, Isabella, Isla, Islaine, Joseli, Larissa, Marília, Saravanan, Saulo, Tatianny e Valléria), por terem “aberto as portas” da Universidade Federal de Sergipe e por terem apresentado a pesquisa e a “vida científica”. Pela amizade, dedicação, receptividade, acolhimento, ensinamentos, reconhecimento, enfim por tudo, sou muito grata!;
- Aos meus amigos do mestrado, em especial Kathlyn, Ulisses e Vanessa, por compartilhar comigo todas as alegrias e adversidades, desde o processo seletivo para o mestrado;
- A todos os colaboradores, instituições, universidades, laboratórios, professores, alunos;
- A todos que fazem o Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;
- A CAPES, pelo financiamento, através da bolsa de mestrado.

A todos vocês, o meu muito obrigada!

RESUMO

A formação de complexos de inclusão (CI) com ciclodextrinas (CDs) naturais e sintéticas têm sido um dos principais recursos empregados pela indústria farmacêutica nos últimos anos, com o objetivo de aumentar a solubilidade em água de fármacos fracamente solúveis, melhorando sua estabilidade e biodisponibilidade. Dentre as CDs naturais, a β -ciclodextrina (β -CD) é a mais utilizada, uma vez que é obtida com um elevado rendimento e baixo custo, como também, por apresentar tamanho apropriado para acomodar uma grande variedade de substâncias lipofílicas. Assim, a formação de CI acetato de hecogenina/ β -CD (AH/ β -CD), mostra-se favorável, visto que esta saponina pertencente a classe dos glicosídeos esteroidais, com atividades farmacológicas já descritas na literatura, tais como: anti-hiperalgésica, anti-inflamatória e analgésica, apresenta solubilidade limitada em meio aquoso, com formação de espuma persistente e abundante. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos preparar e caracterizar CI AH/ β -CD nas razões molares de 1:1 e 1:2 (AH: β -CD). Os resultados obtidos demonstraram que a liofilização (LI) na razão molar de 1:2 foi o melhor método de complexação, dado que, nas curvas DSC e TG/DTG foi possível observar respectivamente, o desaparecimento do evento característico da fusão do AH, e a redução considerável de perda de massa na primeira etapa ($\Delta m_1 = 5,62 \pm 0,64\%$ entre 30-270 °C), com aumento da temperatura de degradação (247 °C para 300 °C), indicando maior estabilidade térmica. O espectro do FTIR apresentou variações de intensidade e deslocamento de bandas entre 1739 cm^{-1} e 1703 cm^{-1} características de grupamentos carbonila de éster e cetona do AH; o MEV mostrou perda da estrutura cristalina e diminuição de tamanho das partículas; o DRX apresentou diminuição de intensidade e surgimento de novos picos, sugerindo mudança de fase cristalina, a espectrometria de massas e o docking mostrou interação entre o AH e a β -CD e o RMN confirmou a formação de CI pelo método de LI na razão molar de 1:2. Logo, conclui-se que a partir dos resultados obtidos, o melhor método de complexação foi a LI na razão molar de 1:2.

Palavras-chave: ciclodextrinas, complexos de inclusão, acetato de hecogenina.

ABSTRACT

The formation of inclusion complexes (IC) with cyclodextrins (CDs) for natural and synthetic compounds have been a major resources employed by the pharmaceutical industry in recent years, the main aim of this IC is increasing the water solubility of poorly soluble drugs by improving its stability and bioavailability. Among the different kind of CDs, the β -cyclodextrin (β -CD) is mostly used since it is obtained with a high yield and low cost, as well as by presenting appropriate size to accommodate a wide variety of lipophilic substances. Thus, the formation of IC hecogenin acetate / β -CD (HA/ β -CD) shows favorable results, saponin belonging to the class of steroidal glycosides with pharmacological activities described in the literature, such as: anti-hyperalgesic, anti-inflammatory and analgesic, it has limited solubility in aqueous medium with formation of persistent and abundant foam. Thus, this study aimed to prepare and characterize IC HA/ β -CD in molar ratios of 1: 1 and 1: 2 (AH: β -CD). The results demonstrated that freeze-dryer (FD) in a molar ratio of 1:2 was the best complexing method, since the DSC and TG/DTG curves was possible to observe respectively the disappearance of the characteristic event of fusion of the HA and considerable reduction in weight loss in the first stage ($\Delta m_1 = 5.62 \pm 0.64\%$ from 30-270 ° C), with increased degradation temperature (247 ° C to 300 ° C), indicating greater thermal stability. The FTIR spectrum showed variations in intensity and shift bands between 1739 cm^{-1} and 1703 cm^{-1} characteristic carbonyl groups of the ketone and ester of HA. SEM analysis showed the loss of the crystal structure and decrease particle size; the XRD results showed decreased intensity and the appearance of new peaks, suggesting change of crystalline phase to mass spectrometry and docking showed interaction between HA and β -CD and NMR confirmed the formation of IC by the FD method on the molar ratio 1: 2. Therefore, it is conclude that from the results, the best method of preparation of IC was observed in FD method in molar ratio 1: 2.

Keywords: cyclodextrins, inclusion complex, hecogenin acetate

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Ciclodextrinas.....	15
2.2 Obtenção e caracterização dos complexos de inclusão.....	20
2.3 Acetato de hecogenina.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. REFERÊNCIAS	27
5. CONCLUSÃO GERAL	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas e dimensões da α -CD, β -CD e γ -CD.

Figura 2: Comparação esquemática da digestão da α -CD, β -CD e γ -CD.

Figura 3: Estruturas químicas da 2-hidroxipropil- β -CD e sulfobutiléter β -CD.

Figura 4: Esquematização da formação de CI em meio aquoso.

Figura 5: Estruturas químicas dos glicosídeos esteroidais e dos triterpenóides.

Figura 6: Estrutura química do AH (MM = 472,7 g/mol).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características físico-químicas das CDs

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AH	Acetato de hecogenina
CD(s)	Ciclodextrina (s)
CI	Complexos de inclusão
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EM	Espectrometria de massas
FI	Filtração
FTIR	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho
GSH	Glutathiona reduzida
HP β -CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
HP γ -CD	Hidroxipropil- γ -ciclodextrina
KF	Titulação Karl Fischer
LI	Liofilização
MA	Malaxagem
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Mistura física
MPO	Mieloperoxidase
RM β -CD	β -ciclodextrina randomicamente metilada
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBE β -CD	Sulfobutileter- β -ciclodextrina
TG/DTG	Termogravimetria/ termogravimetria derivada

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da degradação enzimática do amido pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase (PONCE CEVALLOS; BUERA; ELIZALDE, 2010). São compostas principalmente por seis, sete ou oito unidades de glicose, unidas por ligações do tipo α -1,4, denominadas respectivamente de α , β e γ CDs. Têm o formato de cone truncado, apresentando grupos hidroxila das unidades glicopirranose orientados para o exterior da cavidade, conferindo caráter hidrofílico à superfície externa. Por outro lado, a cavidade interna das CDs é revestida por átomos de hidrogênio e oxigênio glicosídico, apresentando um caráter relativamente hidrofóbico, que favorece a formação de complexos de inclusão (CI) com moléculas hóspedes lipofílicas de tamanho adequado (LYRA, 2010; RAOOV, 2014; SZEJTLI, 1998).

É importante ressaltar, que a compatibilidade de tamanhos e geometria entre a cavidade das CDs e o hóspede, como também o caráter hidrofóbico deste, são fatores condicionantes para formação de CI (DUCHÊNE; WOUESSIDJEWÉ; PONCHEL, 1999). Diversos compostos são viáveis para formar CI com CDs: compostos alifáticos de cadeia linear ou ramificada, aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos orgânicos, ácidos graxos, compostos aromáticos e aminas, que podem se apresentar nos estados sólido, líquido e gasoso (ANCONI, 2012; DEL VALLE, 2004). A partir da formação dos CI, podem ser observadas alterações nas características físico-químicas intrínsecas das moléculas hóspedes, no que se refere à solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade, proteção oxidativa, redução, racemização, isomerização, polimerização e hidrólise (JANSOOK; LOFTSSON, 2009).

A importância das CDs e suas aplicações têm sido relatadas em inúmeros trabalhos e difundidas nas mais diversas áreas, como por exemplo: nas indústrias de alimentos, cosméticos e no campo farmacêutico em geral, com a finalidade de mascarar sabores e odores desagradáveis, fixar substâncias voláteis, proteger substâncias sensíveis à luz ou ao oxigênio, diminuir efeitos colaterais de fármacos e possíveis interações entre eles, melhorar a solubilidade em água e velocidade de dissolução de fármacos fracamente solúveis,

aumentando sua estabilidade e biodisponibilidade (ÇELIK et al., 2011; PINHO et al., 2014).

Nesse contexto, por a β -CD ser minimamente absorvida no trato gastrointestinal, sendo excretada na urina sem ser metabolizada, não apresentando efeito adicional na farmacocinética da molécula hóspede, como também baixa toxicidade (KURKOV; LOFTSSON, 2013; LI et al., 2014), baixo custo e tamanho apropriado para complexar grande número de moléculas lipofílicas melhorando suas características físico-químicas e biológicas, mostra-se favorável para o desenvolvimento de CI com AH, visto que esta saponina pertencente a classe dos glicosídeos esteroidais, com atividades farmacológicas já descritas na literatura, tais como, anti-inflamatória (PEANA et al., 1997), inibidora seletiva da UDP-glucuronosiltransferase (HASHIZUME et al., 2008), analgésica (GAMA et al., 2013), anti-hiperalgésica (QUINTANS, J. S. et al., 2014) e antitumoral (GASPAROTTO et al., 2014), apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, com formação de espuma (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995).

Adicionalmente, um estudo de mapeamento de tecnologias patenteáveis com o uso do AH, mostrou de maneira geral, que estas tecnologias foram estagnadas na década de 50, reforçando a necessidade de inovação com essa saponina (SERAFINI et al., 2012). Diante disso, pela inexistência de estudos de sistemas de liberação com essa saponina esteroideal, como também, por esta apresentar atividades farmacológicas elucidadas na literatura e baixa solubilidade em meio aquoso, o presente trabalho teve como objetivo, obter CI AH/ β CD nas razões molares de 1:1 e 1:2, afim de investigar e confirmar a formação desses CI por diferentes técnicas de caracterização.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclodextrinas

A descoberta das CDs teve início no final do século XIX, onde o cientista francês Villiers determinou a composição e algumas propriedades químicas dos cristais observados em resíduos de álcool, provenientes da produção de dextrina a partir do amido com uma cultura bacteriana impura (VILLIERS, 1891). No século XX, outro cientista, Schardinger, isolou e nomeou a bactéria responsável pela síntese de CDs o *Bacillo macerans* e a partir daí começaram as primeiras tentativas para distinguir os diferentes tipos de CDs (SCHARDINGER, 1903).

Entre 1930 e 1936 K. Freudenberg, descobriu unidades de maltose ligadas entre si por ligações α -1,4 glicosídica, realizou o primeiro isolamento de CDs puras e descobriu a γ -CD, como também a estrutura cíclica das CDs (FREUDENBERG K.; DELIUS, 1938). Em 1948, Borchert determinou através da difração de raios X as estruturas de α , β e γ CDs. Em 1953, Cramer e Plieninger estudaram as propriedades de CI das CDs (CRAMER, 1953). Os cientistas T. Higuchi e Connors, em 1965, desenvolveram um modelo de inclusão descrevendo matematicamente o mecanismo de complexação e em 1980 U. Brauns, Müller, Pitha começaram a aplicar as CDs nas indústrias de alimentos e cosméticos. No mesmo ano, a hidroxipropil β -ciclodextrina (HP β -CD) foi patenteada na Europa e nos Estados Unidos (BUSCHMANN, 2002; DUCHÊNE et al., 1999; FURUE, 1975; SZEJTLI, 1998).

As CDs são oligossacarídeos cíclicos, não tóxicos, produzidos a partir do amido e constituídos de subunidades α -D-glicopiranosose ligadas entre si por ligações α -1,4 glicosídicas. Diferentes tipos de amidos podem ser utilizados como substrato para produção de CDs, no entanto, o amido de milho e de batata são os mais comumente utilizados por apresentarem maior rendimento. As CDs naturais mais comuns são a α -CD com 6 unidades de glicopiranosose, a β -CD com 7 unidades e a γ -CD com 8 unidades, dispostas em forma de anel, com cavidades internas de aproximadamente 0,6, 0,8 e 0,9 nm de diâmetro, respectivamente (MARQUES, 2010), como podemos observar na Figura 1.

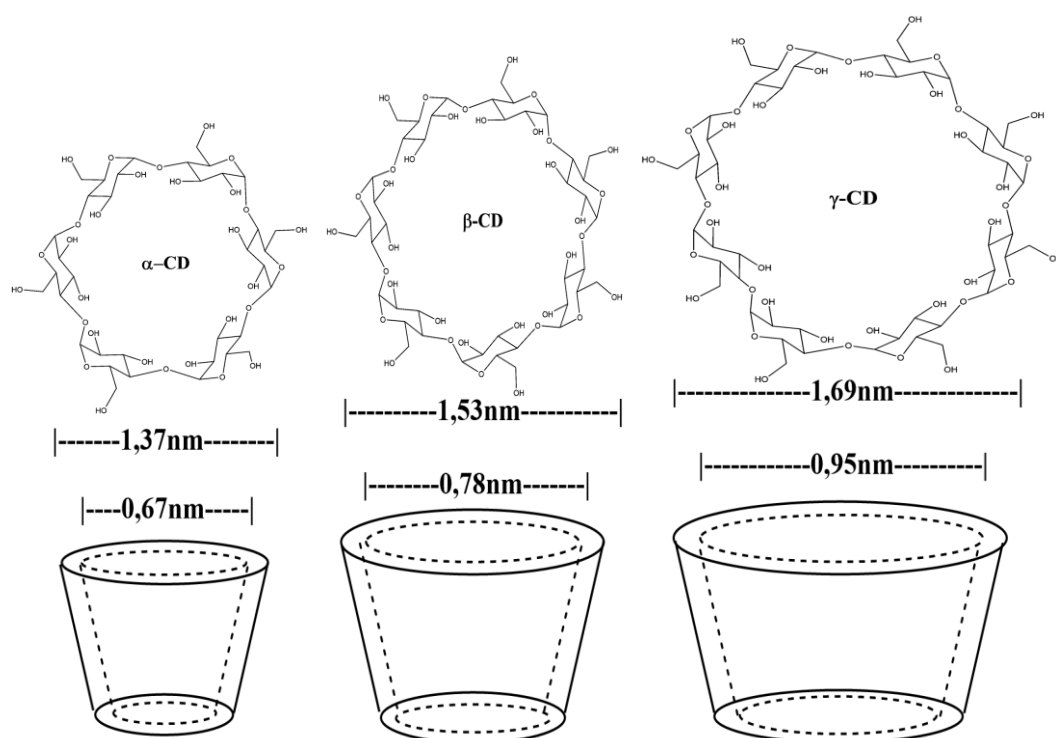


Figura 1. Estruturas químicas e dimensões da α -CD, β -CD e γ -CD

Adaptado de Suárez et al. (SUÁREZ-CERDA et al., 2014)

Em relação a cavidade interna, a α -CD é bastante pequena, o que dificulta sua utilização com algumas substâncias de alto peso molecular. A β -CD apresenta diâmetro apropriado para acomodar uma grande variedade de fármacos e outras substâncias lipofílicas, além de que, dentre as CDs naturais, é a que apresenta o menor custo e o maior rendimento na produção (PESCITELLI, 2010) e a γ -CD que apesar de possuir uma cavidade interna maior que as demais, apresenta custo muito elevado, tornando o seu uso oneroso (ÇELIK et al., 2011).

Essas CDs apresentam as mesmas propriedades físico-químicas e biológicas das dextrinas lineares solúveis em água, porém nestas, as ligações glicosídicas das unidades de glicose são hidrolisadas mais rapidamente. Assim, devido à sua estrutura cíclica, as CDs são cinco vezes mais resistentes à hidrólise não enzimática em comparação com as dextrinas lineares (FRENCH; LEVINE; ET AL., 1949). No estado sólido, as CDs são tão estáveis quanto a sacarose ou o amido e podem ser armazenadas durante vários anos à temperatura ambiente, sem qualquer degradação detectável (KURKOV; LOFTSSON, 2013; SZEJTLI, 1998).

Em soluções aquosas puras, a meia-vida para abertura do anel da β -CD é de aproximadamente 15 h a 70 °C, em pH de 1,1 (HIRAYAMA; YAMAMOTO; UEKAMA, 1992), é bastante estável em meio alcalino e em meio ácido hidrolisa-se com facilidade (VALENTE; SÖDERMAN, 2014). Quando comparada as outras CDs, apresenta baixa solubilidade em água (solubilidade em água a 20 °C; 1,85 g/100 mL), em razão das ligações intramoleculares entre os grupos hidroxila secundários que dificultam a interação da β -CD com as moléculas de água (ÇELIK et al., 2011), apesar disso, é a com maior aplicação no setor farmacêutico, uma vez que é obtida com um elevado rendimento e baixo custo, mais de 10.000 toneladas produzidas por ano, com um preço médio de 5 dólares/Kg (KRANAWETVOGL, 2013).

As unidades de glicopiranoses presentes nas estruturas das CDs determinam a solubilidade em meio aquoso e o diâmetro das cavidades internas e externas das CDs (MANOJ M. NITALIKAR; DINESH M. SAKARKAR; JAIN, 2012), como podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1: Características físico-químicas das CDs

Parâmetros	α -CD	β -CD	γ -CD
Solubilidade em água (mmol.L⁻¹, 25°C)	149	16,3	179
Número de glicopiranoses	6	7	8
Massa molar (g.mol.⁻¹)	972,84	1134,98	1297,12
Diâmetro externo da cavidade mais larga (nm)	1,37	1,53	1,69
Diâmetro interno da cavidade mais larga (nm)	0,57	0,78	0,95
Altura do cone (nm)	0,79	0,79	0,79

A baixa solubilidade em meio aquoso da β -CD é explicada pelas sete moléculas de D-glicopirranose que estruturam o cone e possibilitam a ocorrência de ligações de hidrogênio entre todas as hidroxilas C2 de uma unidade com as hidroxilas C3 da unidade adjacente, conferindo uma estrutura rígida a β -CD. Na α -CD, uma das unidades de glicopirranose é distorcida, impedindo que haja ligação de hidrogênio em todos os grupamentos e na γ -CD o tamanho de sua cavidade é o que permite que esses grupos não sejam coplanares e não interajam entre si, por isso, estas são mais solúveis em meio aquoso do que a β -CD (LOFTSSON; BREWSTER, 2010).

Apesar disso, a β -CD quando administrada por via oral é pouco absorvida no trato gastrointestinal (< 1%) devido a degradação por enzimas e/ou bactérias. Essa pequena fração absorvida é excretada pela urina sem sofrer metabolização, não apresentando efeito adicional na farmacocinética da molécula hóspede (KURKOV; LOFTSSON, 2013; SCARPIGNATO, 2013).




	α -CD	β -CD	γ -CD	
 Boca	↓	↓	↓	α -amilase
 Esôfago Estômago	↓	↓	↓	
 Intestino Delgado Ceco Cólon	↓	↓	Oligômeros lineares, Maltose, Glicose ↓	α -amilase bactérias digestivas } bactérias digestivas
	$\text{CO}_2\text{H}_2\text{CH}_4$	$\text{CO}_2\text{H}_2\text{CH}_4$	$\text{CO}_2\text{H}_2\text{CH}_4$	Gás e fezes moles
CDs nas fezes não metabolizada	0,3 %	> 4 %	0 % mesmo em doses muito altas	
Biodisponibilidade oral	2 a 3 %	\approx 0,3 %	< 0,1 %	

Figura 2. Comparação esquemática da digestão da α -CD, β -CD e γ -CD

Adaptado de Kurkov e Loftsson et al. (KURKOV; LOFTSSON, 2013)

Vale destacar que, vem sendo desenvolvidas técnicas por reações enzimáticas de aminação, esterificação, metilação e eterificação de grupos hidroxila primários e secundários, com objetivo de melhorar as características físico-químicas e biológica da β -CD, abrindo novas portas para o desenvolvimento de formulações injetáveis com maior eficácia. A HP β -CD e a sulfobutiléter β -CD, ilustradas na Figura 3, são exemplos de derivados sintéticos provenientes da β -CD natural bastante utilizados com essas finalidades (KURKOV; LOFTSSON, 2013).

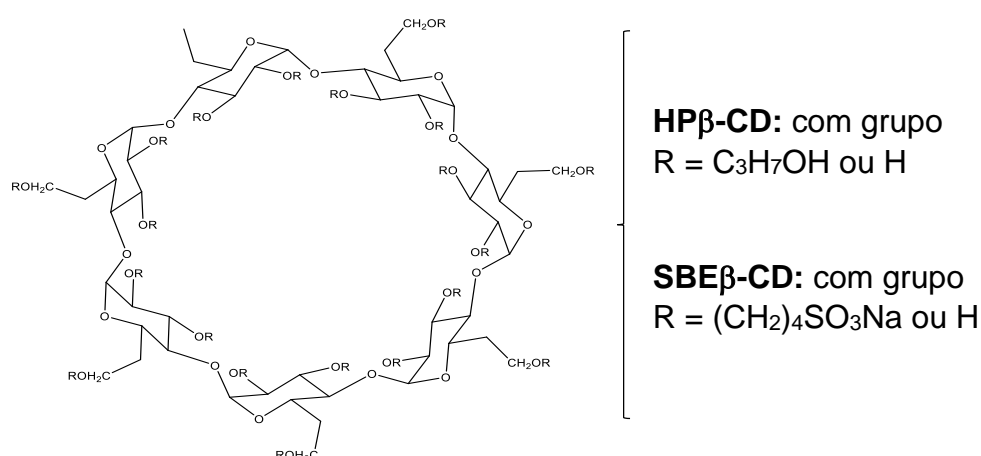


Figura 3. Estruturas químicas da HP β -CD e sulfobutiléter β -CD (SBE β -CD) Adaptado de Araujo et al. (ARAUJO et al., 2006)

Na Figura 5 podemos observar a esquematização da formação de CI em meio aquoso, onde a molécula hóspede está representada pelo círculo de cor preta em destaque e as moléculas de água pelos círculos de cor azul.

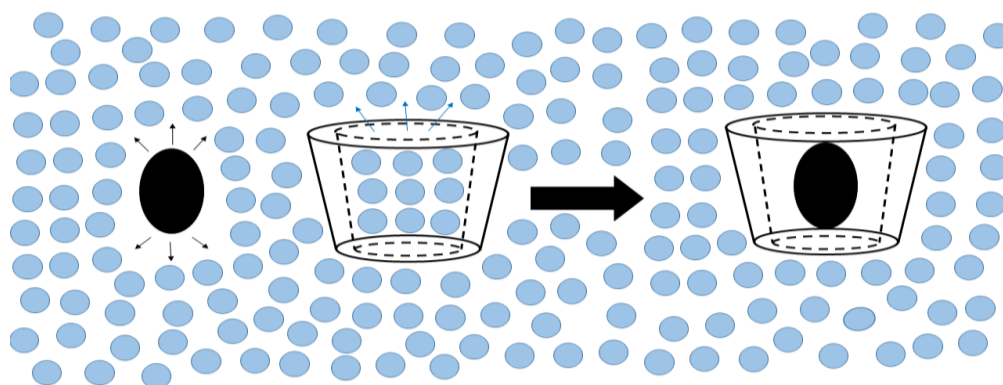


Figura 4. Esquematização da formação de CI em meio aquoso. Adaptado de Astray et al. (ASTRAY et al., 2009)

Os CI estão presentes em solução em equilíbrio dinâmico com os seus constituintes e são caracterizados por uma estequiometria bem definida entre hóspede/hospedeiro e a ausência de ligações covalentes (SZEJTLI, 1998). A ligação hóspede-hospedeiro é um fenômeno de reconhecimento molecular, que envolve interações não covalentes, tais como: forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações do tipo dipolo-dipolo interações eletrostáticas, efeito hidrofóbico, transferências de cargas e efeitos estéricos (SUTHARI et al., 2014).

A partir da formação dos CI, podem ser observadas alterações nas características físico-químicas intrínsecas das moléculas hóspedes, no que se refere por exemplo, à solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (JANSOOK; LOFTSSON, 2009). Inúmeros estudos investigaram a formação de CI com óleos essenciais e β -CD, como também, a influência da formação destes na solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de óleos essenciais. Foram observados nos CI formados, alterações nas características intrínsecas dos óleos essenciais, assim como, melhoria na atividade farmacológica destes quando complexados em β -CD (GALVÃO et al., 2015a;2015b; GUIMARÃES et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2016).

2.2 Obtenção e caracterização dos complexos de inclusão

Os CI podem ser obtidos por diferentes métodos, tais como: mistura física (RIEKES et al., 2010), spray drying, malaxagem (MENEZES, P. P. et al., 2014; PETRALITO et al., 2014), co-evaporação, moagem (MENNINI et al., 2014), co-precipitação, ultrassom (PETROVIC, 2010), liofilização (FERNANDES, 2009), mediante o emprego da tecnologia do fluido supercrítico (ZAFAR; FESSI; ELAISSARI, 2014) ou utilizando irradiação micro-ondas (WEN et al., 2004), dentre outros. Em sistema aquoso, podem ser detectados através de análises por RMN, dicroísmo circular ou ainda através de espectrofotometria de UV-Vis e de fluorescência (SZEJTLI, 1998).

Diversas técnicas são utilizadas para investigar a formação dos CI, porém, apenas às análises de ressonância magnética nuclear (RMN) podem comprovar a estrutura do complexo formado. No entanto as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com

transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) (MENEZES, PAULA P. et al., 2012), fluorescência, espectrometria de massas, espectroscopia de UV-Vis, medidas de condutividade, dentre outras, podem fornecer através da análise e avaliação dos resultados em conjunto, informações importantes sobre os CI formados (HEDGES, 1998; RIBEIRO; FERREIRA; VEIGA, 2003). O emprego dos vários instrumentos de análise permite um adequado e profundo entendimento das interações hóspede-hospedeiro, contribuindo na seleção da CD mais adequada para uma determinada molécula hóspede, bem como a escolha do método de obtenção mais eficaz (MURA, 2015).

O perfil de decomposição térmica avaliado nas curvas DSC das CDs apresenta, eventos endotérmicos que correspondem à sua desidratação, mudança de fase cristalina, fusão e decomposição. Assim, por exemplo, a β -CD, apresenta três eventos endotérmicos, o primeiro é observado na faixa de 30-120 °C caracterizando perda de moléculas de água, o segundo na faixa de 205-230 °C representando um processo físico atribuído à mudança de fase cristalina e o terceiro na faixa de 290-325 °C onde é possível observar a fusão seguida de degradação (GUIMARÃES et al., 2015; GUO et al., 2011).

As alterações observadas nas curvas DSC, tais como redução de tamanho, alargamento, mudança e/ou diminuição da temperatura do pico de fusão do fármaco, são consideradas indicativos de perda da estrutura cristalina do fármaco, como consequência de interações entre os componentes no estado sólido. Porém, a presença residual do pico de fusão do fármaco, embora alargado ou deslocado para temperaturas mais baixas, é indicativo da existência de moléculas livres do fármaco mesmo no estado cristalino, sugerindo a inclusão parcial do fármaco na CD ou até mesmo a não formação do CI, visto que, a formação do CI, muitas vezes apresenta ausência do pico de fusão do fármaco, devido à perda da estrutura cristalina causada pela complexação (AL-MARZOUQI et al., 2007; MURA, 2015).

O TG/DTG é frequentemente utilizado em combinação com a análise de DSC, fornece dados quantitativos de perda de massa com o aumento da temperatura. No caso da β -CD, os principais eventos observados são a perda de água em torno de 100 °C, que pode ser corroborada com as análises

realizadas por titulação Karl Fischer e a decomposição em torno de 290 °C (FERNANDES, 2009; GUIMARÃES et al., 2015). Espera-se que nas curvas TG/DTG o fármaco incluído na cavidade da CD apresente comportamento diferente, quando comparado ao fármaco livre, porque a formação de CI deverá aumentar por exemplo, a estabilidade térmica do fármaco (MURA, 2015).

O FTIR mede a excitação vibracional dos átomos envolvidos em uma ligação química, que estão sendo perturbados durante o processo de complexação. As posições das bandas de absorção no espectro de infravermelho dependem do tipo de grupo funcional presente, cada grupo funcional ligado a diferentes átomos possui uma banda diferente no espectro (FERNANDES, 2009). Alterações nas bandas características da molécula hóspede, como desaparecimento, ampliação, variações na intensidade do pico e/ou mudanças no seu número de onda, pode ser indicativo da formação de CI. Estes eventos podem ser o resultado de restrição das vibrações de alongamento da molécula hóspede e/ou enfraquecimento das ligações inter-atômicas, causadas por inclusão desta na cavidade da CD (MURA, 2015)

O MEV é uma técnica que permite a investigação dos aspectos morfológicos da superfície de sólidos, que ajuda a evidenciar alterações morfológicas que podem estar relacionadas com as interações hóspede-hospedeiro, além de possibilitar informações sobre possíveis contaminações (LYRA, 2010). A profundidade do feixe eletrônico não ultrapassa algumas dezenas de nanômetros e a imagem obtida tem um forte contraste topográfico apresentando o relevo da amostra com um aspeto semelhante ao que teria a observação visual direta ou com uma lupa caso isso fosse possível (PADUKKA; BHANDARI; D'ARCY, 2000).

O DRX é uma técnica analítica não destrutiva, que mede a intensidade de raios X difratados por uma amostra sólida sobre diferentes ângulos. Algumas CDs, no seu estado cristalino formam ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares as quais estabilizam tanto a conformação da molécula, como também a sua estrutura cristalina gerando difratogramas com picos bem definidos (RAOOV, 2014). O emprego desta técnica se baseia na comparação dos difratogramas das substâncias puras e dos CI obtidos. A observação de um difratograma com características de material amorfo, sem picos bem definidos,

pode ser indicativo da formação dos CI (RAJENDIRAN; MOHANDOSS; VENKATESH, 2014).

O RMN em comparação com outras técnicas, é a que mais se destaca na caracterização de CI, pois os espectros de RMN distinguem com clareza os CI formados de outras ligações possíveis entre o hóspede e o hospedeiro. A β -CD por exemplo, consiste de prótons H-1, H-2, H-3, H-4 e H-5, onde H-3 e H-5 estão localizados no interior da cavidade, porém, quando a molécula hóspede é introduzida na cavidade interna desta CD perto dos prótons mencionados, os sinais são ligeiramente deslocados em ^1H RMN (JAHED et al., 2014).

O Docking é uma das técnicas mais importantes na investigação de interações moleculares nos casos em que a estrutura 3D dos compostos já foi elucidada. Esse tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo hóspede-hospedeiro além de calcular os parâmetros de estabilidade relativa. Envolve o conhecimento prévio da conformação do hóspede e sua orientação no sítio de interação com o hospedeiro. Estudos de interação computacional entre compostos são de fundamental importância para entender o mecanismo de associação, o posicionamento tridimensional e a energia de interação. (HUANG, 2014).

2.3 Acetato de hecogenina

As saponinas são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal, atuam como uma barreira química, protegendo as plantas contra a ação de herbívoros e patógenos. Logo, encontra-se em tecidos vegetais que são mais vulneráveis ao ataque de fungos, bactérias e predação por insetos (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014; WINA; MUETZEL; BECKER, 2005). São obtidas principalmente a partir de materiais vegetais, mas várias delas são encontradas no pepino-do-mar e estrela-do-mar-comum (*Asterias rubens*), esta última produzindo-as na forma de glicosídeos esteroidais com um grupo sulfato ligado à parte aglicona (DEMEYER et al., 2014).

De acordo com sua estrutura química, as saponinas são anfipáticas, com propriedade afrogênica (formação de espuma persistente e abundante.), apresentam uma região lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra hidrofílica (açúcares), sendo divididas em duas classes principais: os glicosídeos

esteroidais e os triterpenóides, ilustradas na Figura 6 (HOSTETTMANN; MARSTON, 1995). Apresentam propriedades farmacológicas já descritas na literatura, tais como, antimicrobiana (HASSAN et al., 2010), antitumoral (CHENG et al., 2011), adjuvantes imunobiológicos (ESTRADA et al., 2000; SUN et al., 2010) antioxidante (BI et al., 2012), antidiabética e antiobesidade (JOSEPH; JINI, 2013).

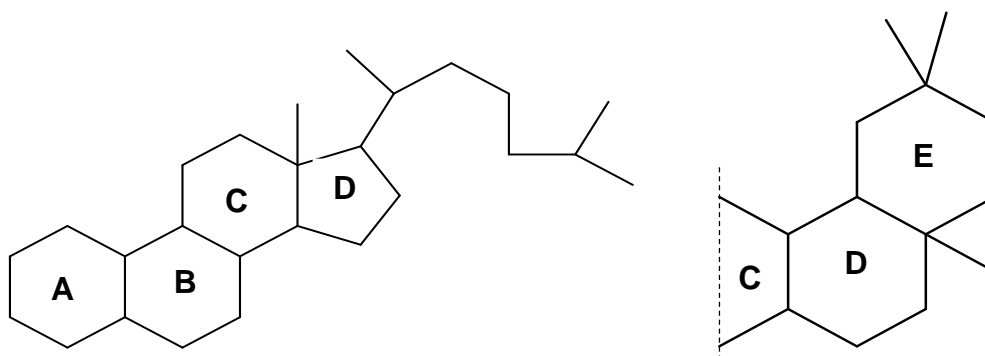


Figura 5. Estruturas químicas dos glicosídeos esteroidais e dos triterpenóides

Dentre as saponinas pertencentes a classe dos glicosídeos esteroidais, temos o AH (Figura 7), encontrado principalmente nas folhas das plantas do gênero *Agave*, incluindo *Agave sisalana*, *Agave cantala* e *Agave aurea*, que são destinadas para produção de saponinas esteroidais (PAIK et al., 2005). Desde muitos anos, o AH vem sendo utilizado na indústria farmacêutica como precursor na produção de corticosteroides, tais como hormônios adrenocorticais (cortisona, cortisol, prednisolona, prednisona, dexametasona, betametasona, etc), hormônios sexuais (progesterona) e hormônios anabólicos (metandienona, stanozolol) (CRIPPS; BLUNDEN, 1978; GUCLU-USTUNDAG; MAZZA, 2007; HOSTETTMANN; MARSTON, 1995; SAKAI; KOEZUKA, 1999).

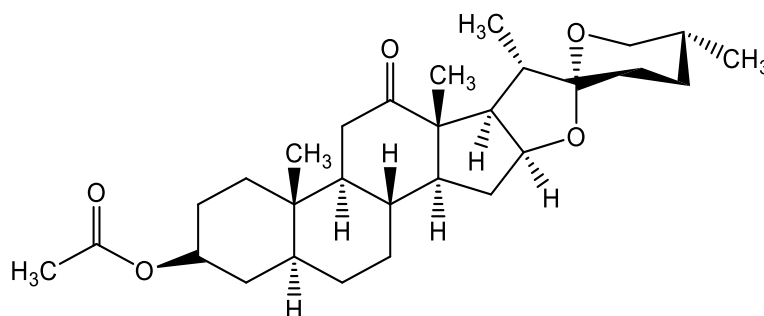


Figura 6. Estrutura química do AH (MM = 472.7 g/mol)

Apresenta propriedades farmacológicas já elucidadas na literatura, como exemplo: anti-inflamatória (PEANA et al., 1997), inibidora seletiva da UDP-glucuronosiltransferase (HASHIZUME et al., 2008), analgésica (GAMA et al., 2013), anti-hiperalgésica (QUINTANS, J. S. et al., 2014) e antitumoral (GASPAROTTO et al., 2014). Gama e colaboradores (2013) estudaram o envolvimento e o mecanismo do efeito antinociceptivo do AH na regulação inibitória descendente da dor e observaram que o AH quando administrado por via intraperitoneal e sistêmica (5-40 mg/kg), em camundongos produziu efeito antinociceptivo mediado por receptores opiáceos (GAMA et al., 2013).

Quintans e colaboradores (2014) evidenciaram que o AH atenua a hiperalgesia mecânica, bloqueando a transmissão neural da dor nos níveis da medula espinhal e por mecanismos relacionados às citocinas inibidoras (QUINTANS, J. S. et al., 2014), e no mesmo ano depositaram uma patente de formulações contendo AH no tratamento da dor (QUINTANS, J. S. S. A., A. R. ; SANTOS, M. R. V. ; SANTANA-FILHO, VALTER J. ; QUINTANS JUNIOR, L. J. ; SERAFINI, MR ; BARRETO, A. S. ; BARRETO, R. S. S, 2014). Gasparotto e colaboradores (2014) mostraram que AH inibiu significativamente o aumento de espécies reativas intracelulares e controlou o ciclo celular e senescência na linhagem de células de câncer de pulmão humano A549 (GASPAROTTO et al., 2014). Masaki e colaboradores (2014) investigaram a interação entre cristais líquidos de diosgenina e β -CD e evidenciaram melhoria na solubilidade e biodisponibilidade desta saponina esteroide (OKAWARA et al., 2014).

Contudo, são inúmeros estudos que abordam sobre CI com CDs, porém, estudos de CI AH/CDs, como também de sistemas de liberação com essa saponina, são inexistentes na literatura. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo, preparar através dos métodos de mistura física (MF), malaxagem (MA), liofilização (LI) e filtração (FI) complexos de inclusão AH/ β -CD, nas razões molares de 1:1 e 1:2 (AH: β -CD), como também, caracterizá-los por calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG), titulação Karl Fischer (KF), espectrofotometria de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX), espectrometria de massas (EM), ressonância magnética nuclear (RMN) e docking.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar complexos de inclusão formados entre acetato de hecogenina e β -ciclodextrina

3.2 Objetivos específicos

- Preparar os complexos pelos métodos de mistura física, malaxagem, liofilização e filtração nas razões molares de 1:1 e 1:2
- Caracterizar os complexos por diferentes técnicas
- Avaliar por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, a formação dos complexos de inclusão obtidos pelo método de liofilização na razão molar de 1:2

4. REFERÊNCIAS

- AL-MARZOUQI, A. H. et al. Evaluation of supercritical fluid technology as preparative technique of benzocaine–cyclodextrin complexes—Comparison with conventional methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 566-574, 2007.
- ANCONI, C. P. A. N. J., C.S.; DE ALMEIDA, W.B.; DOS SANTOS, H.F. Theoretical study of covalently bound α -cyclodextrin associations. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 18958-18964, 2012.
- ARAUJO, D. R. D. et al. Mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) de bupivacaína complexada com ciclodextrinas e anestesia por via subaracnóidea em ratos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 56, n. 5, p. 495-506, 2006.
- ASTRAY, G. et al. A review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1631-1640, 2009.
- BI, L. et al. New antioxidant and antiglycation active triterpenoid saponins from the root bark of *Aralia taibaiensis*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 234-240, 2012.
- BUSCHMANN, H. J., SCHOLLMEYER, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review. **Journal of Cosmetic Science**, v. 53, p. 185-191, 2002.
- ÇELİK, S. E. et al. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 5, p. 1615-1624, 2011.
- CHENG, T. C. et al. Antiproliferation effect and apoptosis mechanism of prostate cancer cell PC-3 by flavonoids and saponins prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 20, p. 11319-29, 2011.
- CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, v. 59, n. 0, p. 16-40, 2014.
- CRAMER, F. K. F., H. PLIENINGER,. **Inclusion compounds of physiologically active organic compounds**. German. 895: 769 1953.

CRIPPS, A. L.; BLUNDEN, G. A quantitative gas-liquid chromatographic method for the estimation of hecogenin and tigogenin in the leaves, juice and sapogenin concentrates of *Agave sisalana*. **Steroids**, v. 31, n. 5, p. 661-9, 1978.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033-1046, 2004.

DEMEYER, M. et al. Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 168, n. 0, p. 1-11, 2014.

DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEW, D.; PONCHEL, G. Cyclodextrins and carrier systems. **Journal of Controlled Release**, v. 62, n. 1–2, p. 263-268, 1999.

ESTRADA, A. et al. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 27-43, 2000.

FERNANDES, L. P. O., W.P.; SZTATISZ, J.; SZILÁGYI, I. M.; NOVÁK, C. Solid state studies on molecular inclusions of *Lippia Sidoides* essential oil obtained by spray drying. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, p. 855–863, 2009.

FRENCH, D.; LEVINE, M. L.; ET AL. Studies on the Schardinger dextrans; the preparation and solubility characteristics of alpha, beta and gamma dextrans. **J Am Chem Soc**, v. 71, n. 1, p. 353-6, 1949.

FREUDENBERG K.; DELIUS, M. M. Dextrine aus Stärke. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 71, p. 1596-1600, 1938.

FURUE, M., HARADA, A., NOZAKURA, S. Preparation of cyclodextrin-containing polymers and their catalysis in ester-hydrolysis. **Journal of Polymer Science** v. 13, p. 357-360, 1975.

GALVÃO, J. G. et al. β -cyclodextrin inclusion complexes containing *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control *Aedes aegypti* larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, p. 14-19, 2015a.

_____. β -cyclodextrin inclusion complexes containing Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control Aedes aegypti larvae. **Thermochimica Acta**, v. 608, n. 0, p. 14-19, 2015b.

GAMA, K. B. et al. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the antinociceptive effect of hecogenin acetate. **J Nat Prod**, v. 76, n. 4, p. 559-63, 2013.

GASPAROTTO, J. et al. Hecogenin acetate inhibits reactive oxygen species production and induces cell cycle arrest and senescence in the A549 human lung cancer cell line. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 14, n. 8, p. 1128-35, 2014.

GUCLU-USTUNDAG, O.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 47, n. 3, p. 231-58, 2007.

GUIMARÃES, A. G. et al. Encapsulation of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano, with β -cyclodextrin, improves the pharmacological response on cancer pain experimental protocols. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, p. 69-76, 2015.

GUO, P. et al. Crystal structure determination of the β -cyclodextrin–p-aminobenzoic acid inclusion complex from powder X-ray diffraction data. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 7, p. 986-990, 2011.

HASHIZUME, T. et al. Identification of human UDP-glucuronosyltransferases catalyzing hepatic 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ conjugation. **Biochem Pharmacol**, v. 75, n. 5, p. 1240-50, 2008.

HASSAN, S. M. et al. Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. **Food Chemistry**, v. 119, n. 2, p. 600-605, 2010.

HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 2035-2044, 1998.

HIRAYAMA, F.; YAMAMOTO, M.; UEKAMA, K. Acid-catalyzed hydrolysis of maltosyl-beta-cyclodextrin. **J Pharm Sci**, v. 81, n. 9, p. 913-6, 1992.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry and pharmacology of natural products—**

Saponins. 1. Cambridge Cambridge University Press, 1995.

HUANG, S.-Y. Search strategies and evaluation in protein–protein docking: principles, advances and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 8, p. 1081-1096, 2014.

JAHED, V. et al. NMR (1H, ROESY) spectroscopic and molecular modelling investigations of supramolecular complex of β -cyclodextrin and curcumin. **Food Chemistry**, v. 165, n. 0, p. 241-246, 2014.

JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. CDs as solubilizers: Effects of excipients and competing drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 379, n. 1, p. 32-40, 2009.

JOSEPH, B.; JINI, D. Antidiabetic effects of Momordica charantia (bitter melon) and its medicinal potency. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 2, p. 93-102, 2013.

KRANAWETVOGL, A. S., J.; MÜLLER, S.; THIERMANN, H.; WOREK, F.; REITER, G. Elimination pathways of cyclosarin (GF) mediated by β -cyclodextrin in vitro: Pharmacokinetic and toxicokinetic aspects. **Toxicology Letters**, v. 222, p. 164–170, 2013.

KURKOV, S. V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 167-180, 2013.

LI, S. et al. Controllable self-assembly of an amphiphilic drug with β -cyclodextrin and α -amylase. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 445, n. 0, p. 67-74, 2014.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 1607-1621, 2010.

LYRA, M. A. M. A., L.D.S.; FONTES, D.A.F.; SOARES SOBRINHO, J.L.; ROLIM NETO P.J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p. 117-124, 2010.

MANOJ M. NITALIKAR; DINESH M. SAKARKAR; JAIN, P. V. The Cyclodextrins: A Review. **Journal of Current Pharmaceutical Research**, p. 10 (1): 01-06, 2012.

MARQUES, H. M. C. A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 313-326, 2010.

MENEZES, P. P. et al. Inclusion complex of (–)-linalool and β -cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2429-2437, 2014.

MENEZES, P. P. et al. Solid-state β -cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45-50, 2012.

MENNINI, N. et al. Physico-chemical characterization in solution and in the solid state of clonazepam complexes with native and chemically-modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 89, n. 0, p. 142-149, 2014.

MURA, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 226-238, 2015.

NASCIMENTO, S. et al. Cyclodextrin-Complexed Ocimum basilicum Leaves Essential Oil Increases Fos Protein Expression in the Central Nervous System and Produce an Antihyperalgesic Effect in Animal Models for Fibromyalgia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, p. 547, 2015.

OKAWARA, M. et al. Effect of liquid crystals with cyclodextrin on the bioavailability of a poorly water-soluble compound, diosgenin, after its oral administration to rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1–2, p. 257-261, 2014.

PADUKKA, I.; BHANDARI, B.; D'ARCY, B. Evaluation of Various Extraction Methods of Encapsulated Oil from β -Cyclodextrin-Lemon Oil Complex Powder. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 1, p. 59-70, 2000.

PAIK, S. Y. et al. The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 5, p. 802-7, 2005.

PEANA, A. T. et al. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. **Planta Med**, v. 63, n. 3, p. 199-202, 1997.

PESCITELLI, G. B., A. R.; BERGONZI, M; C.; VINCIERI, F. F.; DI BARI, L. Cyclodextrins as carriers for kavalactones in aqueous media: spectroscopic characterization of (S)-7,8-dihydrokavain and β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 479-483, 2010.

PETRALITO, S. et al. Spectroscopic characterization of both aqueous and solid-state diacerhein/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 127, n. 0, p. 355-360, 2014.

PETROVIC, G. M. S., G.S.; RADULOVIC, N.S. Encapsulation of cinnamon oil in β -cyclodextrin. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1382-1390, 2010.

PINHO, E. et al. Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 0, p. 121-135, 2014.

PONCE CEVALLOS, P. A.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E. Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (cinnamaldehyde and thymol) in β -cyclodextrin: Effect of interactions with water on complex stability. **Journal of Food Engineering**, v. 99, n. 1, p. 70-75, 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. β -caryophyllene, a dietary cannabinoid, complexed with β -cyclodextrin produced anti-hyperalgesic effect involving the inhibition of Fos expression in superficial dorsal horn. **Life Sciences**, v. 149, p. 34-41, 2016.

QUINTANS, J. S. et al. Evidence for the involvement of spinal cord-inhibitory and cytokines-modulatory mechanisms in the anti-hyperalgesic effect of hecogenin acetate, a steroidal sapogenin-acetylated, in mice. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8303-16, 2014.

QUINTANS, J. S. S. A., A. R. ; SANTOS, M. R. V. ; SANTANA-FILHO, VALTER J. ; QUINTANS JUNIOR, L. J. ; SERAFINI, MR ; BARRETO, A. S. ; BARRETO, R. S. S. **Formulações contendo acetato de hecogenina no tratamento da dor**. INDUSTRIAL, I. N. D. P. Brasil. BR1020140183582, 2014.

RAJENDIRAN, N.; MOHANDOSS, T.; VENKATESH, G. Investigation of inclusion complexes of sulfamerazine with α - and β -cyclodextrins: An experimental and theoretical study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 124, n. 0, p. 441-450, 2014.

RAOOV, M. M., S.; ABAS, M.R. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin Functionalized Ionic Liquid Polymer as a Macroporous Material for the Removal of Phenols and As(V). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 100-119, 2014.

RIBEIRO, L. S.; FERREIRA, D. C.; VEIGA, F. J. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with beta-cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. **Eur J Pharm Sci**, v. 20, n. 3, p. 253-66, 2003.

RIEKES, M. K. et al. Enhanced solubility and dissolution rate of amiodarone by complexation with β -cyclodextrin through different methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 30, n. 7, p. 1008-1013, 2010.

SAKAI, T.; KOEZUKA, Y. Glycolipid derivatives as therapeutic agents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 9, n. 7, p. 917-930, 1999.

SCARPIGNATO, C. Piroxicam-beta-cyclodextrin: a GI safer piroxicam. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 2415-37, 2013.

SCHARDINGER, F. Über die Zulässigkeit des Warmhaltens von zum Gebus bestimmten Nahrungsmittel mittelst Wärme speichernder Apparate, sog. **Wien Klin Wochenschr.**, p. 468-474, 1903.

SERAFINI, M. R. et al. Mapeamento de tecnologias patenteáveis com o uso da hecogenina. **Revista GEINTEC**, v. 2, p. 427-435, 2012.

SUÁREZ-CERDA, J. et al. A comparative study of the effect of α -, β -, and γ -cyclodextrins as stabilizing agents in the synthesis of silver nanoparticles using a

green chemistry method. **Materials Science and Engineering: C**, v. 43, n. 0, p. 21-26, 2014.

SUN, Y. et al. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis* with less adverse reactions. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 5, p. 584-590, 2010.

SUTHARI, P. et al. Investigation of supramolecular stoichiometry and dynamic for inclusion complex of water soluble porphyrin with cucurbit[7]uril by fluorescence correlation spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 284, n. 0, p. 27-35, 2014.

SZEJTLI, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. **Chem Rev**, v. 98, n. 5, p. 1743-1754, 1998.

VALENTE, A. J. M.; SÖDERMAN, O. The formation of host–guest complexes between surfactants and cyclodextrins. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, n. 0, p. 156-176, 2014.

VILLIERS, A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, v. 112, p. 536-538, 1891.

WEN, X. et al. Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 3, p. 517-523, 2004.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production--a review. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 21, p. 8093-105, 2005.

ZAFAR, N.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: From preparation to drug delivery applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1–2, p. 351-366, 2014.

5. CONCLUSÃO GERAL

A caracterização dos métodos de complexação pelas técnicas de DSC, TG/DTG, titulação Karl Fischer, FTIR, MEV, DRX, EM, RMN e docking demonstrou que a LI na razão molar de 1:2, foi o melhor método de complexação, dado que nas curvas DSC foi possível observar o desaparecimento do ponto de fusão do AH, nas curvas TG/DTG uma diminuição de perda de massa considerável na primeira etapa, a qual foi corroborada na titulação Karl Fischer, como também, aumento da estabilidade térmica do AH, sugerindo uma possível formação de complexo entre o AH e a β -CD.

Os resultados de FTIR evidenciaram no método de LI 1:2, a presença de bandas características de carbonila de éster e cetona, como também, do grupo acetato, estes presentes na estrutura química do AH. No MEV, observou-se diminuição de tamanho das partículas e perda da forma cristalina do AH e β -CD. O DRX apresentou o desaparecimento com a diminuição e surgimento de novos picos cristalinos, sugerindo interação entre o AH e a β -CD. Os resultados obtidos por EM, RMN e docking confirmaram a formação de CI pelo método de LI na razão molar de 1:2, onde na EM verificou-se a presença do AH no complexo, através da identificação desta por meio da medição da sua massa molecular e da caracterização de sua estrutura química.

No RMN foi possível observar alterações de desvios químicos de prótons do AH, indicando que estes foram afetados pela proximidade da β -CD, além disso, as alterações de desvios químicos para prótons H-3 e H-5 da β -CD foram maiores em comparação com os prótons localizados na cavidade externa, isso foi corroborado pelo docking, que apresentou um valor negativo da energia de ligação entre o AH e a β -CD, indicando maior estabilidade do complexo, confirmando assim, a formação de CI pelo método de LI 1:2. Esses resultados sugeriram mudanças nas características da molécula hóspede, abrindo caminhos para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas com o acetato de hecogenina e/ou outras saponinas esteroidais.